

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告書

霊長類由来研究資源の保存技術の高度化

分担研究者 山海 直 独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センター、
主任研究員

研究要旨

カニクイザルは様々な医科学研究に用いられている。その研究資源の確保のため、生殖関連細胞の凍結技術の高度化を図り繁殖・育成技術を向上させる意義は大きい。本研究では、凍結融解した卵の質を評価する技術開発を目的として一つの卵で遺伝子解析する技術開発を開始し、免疫染色により詳細に形態を観察するための基礎研究に取り組んだ。また、凍結融解卵巣を移植した個体の解析を昨年につづき実施した。さらに、繁殖効率向上のための基礎データを得るため、初潮の意義を考えるとともに妊娠しない個体に焦点をあて、妊娠しない原因について探求した。

A. 研究目的

1) 凍結融解した個々の卵の質を解析するための技術開発

卵の凍結保存はマウスでは遺伝子バンクとして、また、ヒトでは不妊治療技術のひとつとして応用されている。サル類においても卵の凍結保存の成功例が報告されている。実用化された技術ではあるが、融解卵の質については未だ議論されている。そこで、ひとつひとつの卵の質を評価する技術開発を開始した。メチレーションとアポトーシスに注目し、関連遺伝子の発現を卵で解析した。また、免疫染色により形態解析による評価システムの確立に取り組んだ。なお、本研究では、サル類への応用を視野に入れた手法の確立を目的とし、今回はマウス卵を用いて研究を行った。

2) 凍結保存された卵巣の移植後の状況解析

凍結保存された卵巣の移植後の状況を昨年度につづき継続して検索した。卵巣はメスの生殖細胞である卵細胞を保有し受精可能な状態に成熟させる臓器である。性ホルモン分泌という内分泌機能も有しており、次世代を残すための重要な臓器である。その卵巣の保存技術の開発はメス生物資源の長期保存が可能となるだけでなく、ヒトへの臨床応用が考えられる。これまでにカニクイザルの卵巣まるごとの保存、融解した卵巣の移植実験を行い、本技術が研究資源の保存に応用できる可能性を見出してきた。ここでは約7年前に移植した個体の卵巣の機能について月経を指標として検索し

た。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

霊長類資源を保持する上で、繁殖効率を向上させる意義は極めて大きい。大規模コロニーで効率よく繁殖するにあたり、初潮や月経などメスカニクイザルの生理的データやどのような個体が妊娠する傾向にあるかという妊娠傾向の解析を行った。また、生理的データや交配における妊娠傾向を加味した上で計画的に雌雄同居させ、なぜ妊娠しないのかに焦点を当てた解析を実施した。

B. 研究方法

1) 凍結融解した個々の卵の質を解析するための技術開発

マウス胚盤胞を材料とした。mRNAを抽出後、H19 遺伝子とハウスキーピング遺伝子として GAPDH 遺伝子を増幅し、SYBR green を用いた相対定量法により H19 遺伝子発現を定量した。また、凍結前と融解後の拡張期胚盤胞を 1% PFA で固定し、0.5% TritonX-100 で処理したのち、1% BSA バッファーで洗浄、Phalloidin および DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) で染色した。染色した卵をコンフォーカルマイクロスコプで観察した。マウス卵の凍結は、DAP213 を用いた手法で行った。

2) 凍結保存された卵巣の移植後の状況解析

約7年前に5頭のカニクイザルから卵巣を摘出し、まるごと凍結した。1ヶ月の間、

液体窒素中で保存し、その卵巣を融解して元の個体に移植した。凍結は微弱エネルギーを負荷した環境で-30℃までプログラムフリーザーを用いて低下させ、その後、液体窒素に入れるという手法で実施した。融解は、37℃のお湯に浸漬することで行い、その卵巣を大腿の骨格筋内あるいは腎皮膜下に移植した。移植した5頭のうち4頭で比較的早期に月経が出現することを確認しており、性ホルモンの動態からも凍結融解卵巣が機能していることを見出した。これらの個体は現在も外見上問題なく生存しており、今回、月経の状況を解析することで、移植した卵巣の内分泌機能の保持について推察した。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

カニクイザルのメス 43 頭を解析対象とし、初潮の日齢、月経が安定するまでに要する日齢を解析した。また、オス 1 頭が 2 頭のメスと 1 日おきに同居する交配方法（隔日同居交配）を設定し、2 頭のメスのうち一方だけが妊娠し、もう片方のメスが妊娠しなかったケースを解析対象（ $n = 94$ ）として、2 頭のメスに年齢や、過去の妊娠歴にどのような差異があるか解析した。これらの一連の解析結果より、メスの安定を見計らい、過去の妊娠経験やメスの年齢に差をつけた隔日同居交配を設定し、交尾成立の確認実験を行った。具体的には雌雄同居の翌日にメスの膣スミアを顕微鏡で観察し、膣スミア中の精子の有無により交尾成立を判定した。この膣スミアによる行動観察実験には隔日交配 11 セット計 22 個体のメスカニクイザルを用いた。

（倫理面への配慮）

本研究は医薬基盤研究所の動物実験委員会の承認を得て実施した。実験実施時の動物への苦痛の軽減を原則とし飼育環境の整備にも十分に配慮した。

C . 研究結果

1) 凍結融解した個々の卵の質を解析するための技術開発

マウス胚盤胞を用いた H19 遺伝子の定量 PCR では胚盤胞 5 個から抽出したサンプルにおいて遺伝子特異的な増幅が確認された。

Phalloidin および DAPI で染色したのち観察した結果、凍結融解した胚盤胞ではアクチンフィラメント（細胞骨格）が崩壊していることが確認され、凍結融解による形態的ダメージが観察された。

2) 凍結保存された卵巣の移植後の状況解析

まると凍結した卵巣を融解して移植した5頭のカニクイザルは、移植後、約7年が経過しているが、未だ月経が認められる個体が存在することが明らかとなった。直近3年間に確認された月経の回数はそれぞれ、5、0、2、8、3回であり、直近1年間に確認された月経の回数はそれぞれ3、0、0、2、2回であった。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

室内繁殖コロニーにおけるカニクイザルの初潮は 1149.1 ± 216.7 日齢（約3歳）で認め、月経が安定する（定期的に3回月経が認められる）のは 1505.9 ± 388.1 日齢（約4歳）であった。隔日同居交配での妊娠傾向を解析した結果、経産メスかつ高齢のメスがより多く妊娠していた。また、未経産メスにおいては、若齢にて妊娠していた。膣スミアによる精子確認では、経産メスでは12頭中10頭で精子が確認され、月経周期に関わらない交尾成立が確認された。一方で、未経産メスでは10頭中2頭のみで精子が確認された。

D . 考察

1) 凍結融解した個々の卵の質を解析するための技術開発

今回、H19 遺伝子の発現を捉えることに成功したが、検出には5個の胚盤胞を用いている。今後、よりの高い Taqman PCR 系を確立し、1 個の受精卵で解析することを目指す。また、Multi-color Taqman PCR 法を用いることで、H19 遺伝子の他に、Mest 遺伝子等複数のメチレーション関連遺伝子を同時に定量することで卵の質をより詳細に解析することが可能になると考えている。p53 遺伝子等のアポトーシス関連遺伝子についても Multi-color Taqman PCR 系を確立することで、多方面から卵の質の評価を可能にしたい。Phalloidin および DAPI の染色により、卵の形態評価がある程度可能で

あることが確認されたが、ミトコンドリアをはじめとする細胞小器官を染色することで、詳細な質評価が可能になると考えている。

2) 凍結保存された卵巣の移植後の状況解析

凍結融解卵巣の移植後、約7年経過しているにも関わらず、月経を認めた個体が存在することの意義は大きい。しかし、昨年(移植後約6年)の結果と比較すると明らかに劣っており、移植した卵巣が失活しつつあるのかもしれない。性ホルモンの動態とあわせて解析する必要があり、また、外部からのホルモン投与により卵巣を刺激し、卵巣が発育するか否かについて検討したい。

3) 繁殖効率向上のための基礎データの解析

室内繁殖コロニーにおけるカニクイザルの初潮は約3歳であり、月経の安定まで1年の期間を要する。月経の発現は若くして認められるが、月経の発現だけでなく生理学、社会学、行動学的な成熟は初潮だけを目安にはできないのかもしれない。もし、若すぎる妊娠による流産、死産の危険性などがあるとすれば、様々な観点から性成熟を判断することがメスの身体的な負担軽減、エンリッチメントや動物福祉を考えるうえで意義のある研究結果であると考えられる。隔日同居交配での妊娠傾向の分析では、経産メスで高齢のメスがより多く妊娠に至っており、未経産個体においては年齢要因が逆転し、より若いメスが妊娠していた。これらの結果をまとめると、若くして初妊娠を経験し、その後年齢を重ねる度に妊娠しやすくなるということになる。この情報は繁殖効率向上を検討する上で貴重な結果である。膣スミア中の精子確認実験により、多くの経産メスは最長3ヵ月間の雌雄同居期間中に複数回の交尾成立が確認された。一方で、未経産メスの多くは交尾すらしていないことが明らかとなり、交尾が見られた場合もごく少量の精子が確認されただけであり交尾回数も少なかった。これら結果は上述した隔日同居交配における妊娠傾向解析での事実を裏付けており、経産メスは同居期間中交尾行動が確認され、未経産メスでは交尾をしないため妊娠できないことが明らかとなった。交尾の行動障害は様々

な要因が考察されてきたが、今回明らかになった未経産メスで認められる交尾を行わない実態の要因については、心理、行動、成育歴等の詳細な解析が必要である。

E. 結論

今回、霊長類資源の凍結保存、繁殖技術の向上を目指した研究を実施し、以下の3つの結論を得た。

1) マウス胚盤胞5個から mRNA を抽出し、メチレーション関連遺伝子 H19 の定量に成功した。今後、1個の胚盤胞での遺伝子解析を試みる予定である。

2) 凍結融解卵巣を移植し約7年経過した個体の月経発現を見たところ、昨年よりもその回数が減少していた。すなわち、移植卵巣の内分泌機能が低下しつつある可能性が考えられた。

3) カニクイザルの初潮は約3歳、月経周期が安定するのは約4歳であった。また、妊娠しない個体は、交尾すら成立していないことが明らかとなった。さらに、はじめて妊娠する個体は5歳で多く認められることから、生理的性成熟と社会的性成熟には時間的ズレがある可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

L. Yasmin, J. Takano, Y. Nagai, J. Otsuki, T. Sankai
Detecting and quantifying male-specific fetal DNA in the serum of pregnant cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Com. Med.*, 65: 70-76, 2015

K. Honsho, M. Hirose, M. Hatori, L. Yasmin, H. Izu, S. Matoba, S. Togayachi, H. Miyoshi, T. Sankai, A. Ogura, A. Honda
Naïve-like conversion enhances the difference in innate *in vitro* differentiation capacity between rabbit ES cells and iPS cells
J. Reprod. Dev. 61: 13-19, 2015

A. Honda, M. Hirose, T. Sankai, L. Yasmin, K. Yuzawa, K. Honsho, H. Izu, A. Iguchi, M. Ikawa, A. Ogura
Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of *Tyrosinase* gene using CRISPR/Cas9
Exp. Anim. 64: 31-37, 2015

M. Hatori, N. Shimozawa, L. Yasmin, H. Suemori, N. Nakatsuji, A. Ogura, K. Yagami, T. Sankai
Role of retinoic acid and fibroblast growth factor 2 in neural differentiation from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) embryonic stem cells
Comp. Med. 64: 140-147, 2014

2. 学会発表 (国際学会)

M. Yoshida- Kobayashi, T. Koyama, Y. Yasutomi, T. Sankai
Psycho-behavioral approach to why male monkey prefers multiparous female to nulliparous one.
The 25th Congress of the International Primatological Society (Hanoi, Vietnam)
August 11-16, 2014

P. Pomchote, T. Sankai, Y. Hamada
Age-related bone changes in two macaque species which are difference in positional behavior
The 25th Congress of the International Primatological Society (Hanoi, Vietnam)
August 11-16, 2014

A. Honda, M. Hirose, T. Sankai, L. Yasmin, K. Yuzawa, K. Honsho, H. Izu, M. Ikawa, A. Ogura., Single-step generation of rabbits carrying at targeted allele using CRISPR/Cas9
World congress of reproductive biology 2014 (Edinburgh, Scotland) September 2-4, 2014

A. Nishimoto-Kakiuchi, S. Netsu, S. Okabayashi, O. Kondoh, R. Konno, T. Sankai
Analysis of spontaneous endometriosis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) by laparoscopy and MRI,
12th World Congress on Endometriosis (Sao Paulo, Brasil) April 30 – May 3, 2014

S. Netsu, A. Nishimoto-Kakiuchi, S. Hayashi, O. Kondoh, T. Sankai, R. Konno
Surgically induced endometriosis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)
12th World Congress on Endometriosis (Sao Paulo, Brasil) April 30 – May 3, 2014

A. Nishimoto-Kakiuchi, S. Netsu, S. Hayashi, A. Kato, R. Konno, T. Sankai
Nerve fiber and lymphoid nodule were observed in pathological and immunohistological analysis of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with spontaneous endometriosis,
12th World Congress on Endometriosis (Sao Paulo, Brasil) April 30 – May 3, 2014

(国内学会)

坂本淳平、谷口遼馬、加田日出美、山海直、堤治、本橋秀之
産仔への発生能からみたマウス卵母細胞体外成長培養における代替血清の可能性
第59回日本生殖医学会(東京)2014年12月4、5日

本多新、廣瀬美智子、山海直、ルブナ・ヤスミン、湯澤和明、本勝希実子、伊豆美奈、伊川正人、小倉淳郎
CRISPR/Cas9によるウサギチロシナーゼ遺伝子の破壊
第37回日本分子生物学会年会(横浜)2014年11月25 - 27日

本多新、廣瀬美智子、山海直、ヤスミン・ルブナ、湯澤和明、本勝希実子、伊豆美奈、伊川正人、小倉淳郎
CRISPR/Cas9によるウサギTyrosinase遺伝子の破壊
第4回ゲノム編集研究会(広島)2014年10月6、7日

山海直
最新生殖工学と幹細胞研究トピックス
岡山大学生殖補助医療技術教育センター公開講座(東京)2014年10月25日

中山駿矢、鯉江洋、金山喜一、片貝祐子、山海直、揚山直英
カニクイザル(*Macaca fascicularis*)における血液ガスおよび全血球計算基準値の確立に関する研究
第20回日本野生動物医学会(つくば)2014年9月16-19日

岩元正樹、矢崎智子、大石貴嗣、井上貴美子、小倉敦郎、山海直

EGFP遺伝子導入したカニクイサル細胞を用いた異種核移植胚の作出
第107回日本繁殖生物学会(帯広)2014年8月21-24日

L. Yasmin, J. Takano, T. Sankai
Frequencies of fatal cellular and cell-free DNA in maternal blood of pregnant cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)
第107回日本繁殖生物学会(帯広)2014年8月21-24日

本勝希実子、廣瀬美智子、羽鳥真功、ルブナ・ヤスミン、榎谷内純恵、三好浩之、山海直、小倉淳郎、本多新
ナীব様変換ウサギES細胞の質的向上とその解析
第3回ウサギバイオサイエンス研究会(甲府、山梨)2014年8月2日

M. Yoshida-Kobayashi, T. Koyama, Y. Yasutomi, T. Sankai
Were cynomolgus monkey females with more gravidas chosen by males?
第74回動物心理学会(犬山)2014年7月19-21日

P. Pomchote, T. Sankai, Y. Hamada
Bone mineral density, osteoarthritis, and menstrual status in long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*)
第30回日本霊長類学会(大阪)2014年7月4-6日

池田ゆうき、長谷川昭子、荻野舞、山海直、柴原浩章
カニクイサル卵巣におけるアンドロゲン受容体の免疫組織学的検討
第55回日本卵子学会(神戸)2014年5月17、18日

ルブナ・ヤスミン、高野淳一郎、山海直
妊娠カニクイサル血中に存在するオス胎児由来 SRY 遺伝子と DYS14 の検出量の比較
第61回日本実験動物学会総会(札幌)2014年5月15-17日

根津幸穂、西本(垣内)綾子、満下淳地、山海直、今野良
カニクイサルにおける子宮内膜症外科的誘因モデルの作成手法の確立
第66回日本産婦人科学会(東京)2014年4月18-20日

3. その他
山海直
医科学研究のためのカニクイサル 発生工学と先端技術開発の視点から
Labio 21(日本実験動物協会情報誌) 56: 20-23, 2014

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし